

Zur Fluoridempfindlichkeit Kariogener Plaque-Streptokokken

vorgelegt

von

Ursula Kröncke

aus

Hamburg

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
(Direktor: Prof. Dr. A. Kröncke)
in der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Erlangen-Nürnberg

Zur Fluoridempfindlichkeit Kariogener Plaque-Streptokokken

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Ursula Kröncke
aus
Hamburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. L. Demling
Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 1974

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
III. MATERIAL UND METHODEN	5
A. Bakterien	5
1. Beschreibung der Bakterien- stämme	5
2. Bakterienanzucht	11
3. Zusammensetzung und Herstel- lung von festen und flüssigen Nährböden	11
B. Manometrie	12
1. Prinzip	12
2. Ansätze	12
C. Versuchsbeschreibung	14
IV. ERGEBNISSE	15
A. Der Einfluß von Natriumfluorid	15
B. Der Einfluß von Aminfluorid	22
C. Vergleich des Hemmeffektes von Natriumfluorid und Aminfluorid	27
V. DISKUSSION	28
VI. ZUSAMMENFASSUNG	30
VII. Schrifttum	31

I. Einleitung und Problemstellung

=====

Ursachen und Entstehung kariöser Läsionen versuchte man schon im Mittelalter durch verschiedene Hypothesen und später durch experimentell untermauerte Theorien zu erklären. Heute ist man sich darüber einig, daß 4 Faktorengruppen zusammenwirken müssen (KÖNIG, 10):

1. Wirtsorganismus mit kariesanfälligen Zähnen,
2. Mikroorganismen in der Zahnplaque,
3. Substrat für die Mikroorganismen, insbesondere niedermolekulare Kohlenhydrate,
4. Zeit.

In diesem Rahmen besitzen die als kariogen erkannten Streptokokkenstämme, die sich immunologisch und vor allem durch verschiedenes Stoffwechselverhalten voneinander unterscheiden, große Bedeutung. Es handelt sich dabei um fakultativ anaerobe Bakterien, die unter anaeroben Bedingungen optimal vegetieren. Neben aeroben Neisserien, anaeroben Veillonellen und vielen anderen ubiquitären Mikroorganismen sind sie in den Bakterienbelägen an Zähnen in überwiegender Anzahl vertreten. Ihre Aktivität ist für die kariöse Zerstörung der Zähne entscheidend verantwortlich, indem sie die in die Plaques hineindiffundierenden Zucker zu Säuren abbauen. Diese greifen die Apatitkristalle an und entmineralisieren so die Zahnhartsubstanzen, wenn der kritische pH-Wert von 5,5 unterschritten wird (BRAMSTEDT und TRAUTNER, 3).

Experimente von B. u.E. RANKE (12) sowie von BRAMSTEDT und TRAUTNER (3) befaßten sich mit Streptokokkenstämmen, die der Gruppe *S. mutans* angehören; sie fanden folgende kariesfördernden Eigenschaften:

1. Starke Säureproduktion,
2. Bildung von intrazellulären Polysacchariden vom Glykotyp als Kohlenhydratreserve,
3. Bildung von extrazellulären Polysacchariden als Plaquebausteine.

Dieselben Eigenschaften wurden auch bei manchen Streptokokken der Sanguis-Art gefunden.

Diese kariesbegünstigenden Faktoren gilt es bei der Kariesprophylaxe besonders zu beachten, weil es deren Ziel ist, das Entstehen kariöser Läsionen möglichst frühzeitig zu blockieren. Kariesprophylaxe kann auf verschiedene Art und Weise wirkungsvoll betrieben werden: zum Beispiel durch Ernährungslenkung, gute Mundhygiene, Verbesserung der Zahnmorphologie und Zahnstellung wie auch durch exogene Fluoridzufuhr. Fluorid hat im Rahmen der Kariesprophylaxe mehrere Angriffspunkte, die von KÖNIG (10) ausführlich erörtert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die sauren Stoffwechselprodukte der kariogenen Plaquestreptokokken durch die antienzymatische Wirksamkeit genügend hoher Fluoridkonzentrationen zu vermindern. Besonders empfindlich auf Fluorid reagieren die Enolase und Phosphoglucomutase, was auch aus Untersuchungen von CIMASONI (6) hervorgeht.

Diese Feststellungen wurden bisher jedoch nur recht allgemein für Plaques getroffen, ohne deren Eigenschaften und Verschiedenheiten im einzelnen zu berücksichtigen, wie sie sich durch unterschiedliches Alter, Dicke oder Lokalisation ergeben. Es ist noch nicht einmal bekannt, ob sich die als kariogen erkannten Streptokokkenstämme unter dem Einfluß von Fluoriden gleichartig oder verschieden verhalten. Dieser speziellen Frage gelten daher die nachfolgenden Untersuchungen.

Mit Hilfe der manometrischen Methode von Otto WARBURG soll die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Natriumfluorid und Aminfluorid auf den anaeroben Kohlenhydratstoffwechsel einiger isolierter Streptokokkenstämme untersucht werden.

II. Literaturübersicht

=====

Über Möglichkeiten, Wirkungsweise und Anwendung kariesprophylaktischer Maßnahmen wurden zahlreiche Untersuchungen und Artikel veröffentlicht. Nur wenig wurde bisher jedoch auf den Kern der vorliegenden Arbeit, nämlich auf die Fluoridhemmung der Enzyme des Kohlenhydratabbaus bei kariogenen Plaquestreptokokken eingegangen.

CIMASONI (5) befaßte sich experimentell mit dem Hemmmechanismus von Fluorid auf Enzyme in Gegenwart und beim Fehlen von Phosphat. Er bezog sich dabei aber nicht speziell auf den Zuckerabbau von Plaquebakterien. Weiterhin untersuchte er die Art der Komplexverbindungen, die das Fluorid während des Hemmungsvorganges eingeht.

KÖNIG (10) diskutiert zahlreiche Möglichkeiten der Kariesprophylaxe, darunter auch die Fluoridhemmwirkung in den Bakterienbelägen.

Speziell den Fragenkomplex der Kariesverminderung durch Hemmung des bakteriellen Säurebildungsvermögens griffen CAPOZZI, BRUNETTI, NEGRI und MIGLIORINI (4) auf. Sie untersuchten die antienzymatische Wirksamkeit von Fluoridverbindungen, darunter auch NaF und Aminfluorid,

an Laktobazillen. Dabei fanden sie heraus, daß besonders die Enolase und Phosphoglucomutase gehemmt wurden.

JENKINS (9) beschreibt in einem Beitrag die Rolle des Fluorids bei der Kariesverminderung; er geht dabei auch auf die antienzymatische Wirkung von Fluorid ein.

BRAMSTEDT (1) erörtert den Wirkungsmechanismus der Fluoride als karieshemmende Substanzen. Danach kann es durch Akkumulation von Fluoridionen in den Plaques zu Konzentrationen kommen, die die bakterielle Säureproduktion zu hemmen vermögen.

BRAMSTEDT und BANDILLA (2) untersuchten mit Hilfe der Warburg-Methode den Einfluß von Aminfluorid auf die Säurebildung und Polysaccharidsynthese von Plaquestreptokokken. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß im Gegensatz zu Natriumfluorid bereits sehr geringe Konzentrationen von Aminfluorid hohe Wirksamkeit entfalten.

W. SCHWARZ (14) untersuchte im Rahmen seiner Diplomarbeit, ob sich das Säurespektrum einiger Streptokokkenstämmen unter dem Einfluß bestimmter Fluoridkonzentrationen verändert. Er arbeitete dabei mit Stämmen, die auch von mir untersucht wurden. Das Ausmaß der Fluoridhemmung weicht bei seinen Untersuchungen jedoch deutlich von meinen Ergebnissen ab. Das ist vermutlich auf die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen und erheblich abweichenden Versuchsbedingungen zurückzuführen. Deshalb werden diese Untersuchungen auch im Abschnitt V (Diskussion) nicht mehr berücksichtigt. Mit Versuchen an 14-16jährigen Schuljungen konnten LOESCHE, MURRAY und MELLBERG (11) die Wirksamkeit von APF- (=saures Phosphorfluorid) Gel zeigen. Nach dieser

Behandlung stieg der Fluoridgehalt der Schmelzoberfläche erheblich an. Außerdem verminderte sich nach 6-tägiger Anwendung der Prozentsatz an *S. mutans* signifikant, während allerdings der Prozentsatz an *Streptokokkus sanguis* unverändert blieb.

III. Material und Methoden

=====

A. Bakterien

1. Beschreibung der Bakterienstämme

Für die Versuche wurden isolierte Streptokokkenstämme in Reinkulturen verwendet, die der Gattung *S. mutans* oder *sanguis* angehören oder Zwischenformen bilden:

a) Die Stämme OMZ 176, OMZ 9, OMZ 51, OMZ 61, OMZ 71, stellte uns Prof. Guggenheim aus dem Kariesforschungsinstitut der zahnärztlichen Hochschule Zürich dankenswerterweise zur Verfügung. Sie wurden von GUGGENHEIM (8) genau beschrieben und nach ihren Stoffwechselleistungen in verschiedene Biotype eingeteilt. Er bewertete dafür folgende Eigenschaften:

Fermentation von Mannit, Sorbit, Trehalose, Inulin, Melibiose, Raffinose, Cellobiose, Salicin, Äsculin und α -Methylglykosid, Wachstum auf Nährböden mit einem Salzgehalt von 2,5 %, 4 %, 6 %, Wachstum bei 45°C, Reduktion und Koagulation von 0,01 % Methylenblau-Milch, Wachstum auf Galle-Blutagar, Produktion von Acetylmethylcarbinol, NH_3 -Entwicklung aus Arginin und haemolytische Reaktionen.

Aus dieser Arbeit (8) möchte ich 3 Tabellen herausgreifen, die einen Überblick über die Eigenschaften der OMZ-Stämme geben, berücksichtige dabei jedoch nur

die von mir untersuchten Stämme.

Tab.1: Kariogenität der in dieser Arbeit verwendeten
OMZ-Stämme (Auszug aus Angaben von GUGGENHEIM,8)

OMZ-Stamm	Verwandtschaft der Art	Karies-Aktivität		
		Fissu- ren	buccale Fläche	Zahn- hals
51	S. mutans	++	+	-
61	S. mutans	++	++	+
71	S. mutans	+	++	-
176	S. mutans	++	++	-
46	Zwischenform	+	-	++
9	S. sanguis	++	+	++

++ = hohe Aktivität

+ = mäßige Aktivität

- = keine Aktivität

Tab.2: Stoffwechselleistungen der *S. mutans*
(Auszug aus Angaben von GUGGENHEIM, 8)

	51	61	71	176
Mannit	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+
Inulin	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	<u>+</u>
Cellobiose	+	+	+	<u>+</u>
Trehalose	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
Äsculin	+	+	+	-
4 % NaCl	+	+	+	+
Melibiose	+	+	-	-
α -Methylglykosid	<u>+</u>	-	<u>+</u>	-
Ribose	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
6,5 % NaCl	-	-	-	+
NH, aus Arginin	+	-	+	-
0,01% Methylen-blau-Milch ¹⁾	+	-	+	-
Haemolyse	γ	γ	<u>$\pm\alpha$</u>	α
Acethyl-Methylcarbinol	+	+	+	+
10 % Galle-Blutagar	+	<u>+</u>	+	+

1) koaguliert und reduziert

Tab.3: Der hier untersuchte *S. sanguis* besitzt folgende Eigenschaften (Auszug aus Angaben von GUGGENHEIM, 8)

	9
NH ₃ aus Arginin	+
Mannit	-
Inulin	+
Raffinose	+
Melibiose	+
Salicin	+
Äskulin	+
Extrazelluläres Dextran	+
Lancefield-Gruppe H	-
6,5 % NaCl	-
4 % NaCl	+
Hämolyse	α
10 % Galle-Blutagar	+

Für die Klassifizierung der Stämme wurden von GUGGENHEIM (8) auch serologische Eigenschaften herangezogen: OMZ 51 und OMZ 71 reagieren positiv gegen das Antiserum der Lancefield-Gruppe FA, OMZ 61 und OMZ 176 reagieren positiv gegen das Antiserum der Lancefield-Gruppe HS.

b) Die Stämme 290, 275, 407 431 und 249 wurden freundlicherweise von der Abteilung für experimentelle Zahnheilkunde der Universitätsklinik für Zahn-,Mund- und

Kieferkrankheiten Würzburg zur Verfügung gestellt. Ihre Stoffwechseleigenschaften wurden von GEHRING (7) ausführlich beschrieben. Nach seinen Angaben handelt es sich um grampositive, serologisch nicht eingrupprierbare Streptokokkenarten. Die folgende Tabelle, die ich seiner Arbeit entnehme, soll einen Überblick über die Stoffwechselleistungen dieser Stämme vermitteln. Dabei berücksichtige ich wiederum nur die von mir untersuchten Stämme:

Tab.4: Stoffwechselleistungen der in dieser Arbeit
untersuchten Stämme (Auszug aus Angaben von
GEHRING, 7)

Eigenschaften	249	275	290	407	431
<u>Vergärung von:</u>					
Fructose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Galaktose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Glukose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Mannose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Ribose	+ / 2	+ / 2	+ / 1	+ /	-
Cellobiose	+ / 1	+ / 1	-	+ / 6	-
Laktose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Maltose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Melibiose	-	-	-	-	-
Saccharose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Trehalose	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Glucosamin	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
Mannit	+ / 1	+ / 1	+ / 2	+ / 1	+ / 1
Sorbit	+ / 1	+ / 1	-	-	-
Äskulin	+ / 1	-	-	-	-
Inulin	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
Salicin	+ / 2	+ / 4	-	-	+ / 5
α-Methylglucosid	-	-	-	-	+ / 1
VOGES-PROSKAUER-Reaktion	-	-	-	-	+
Verhalten in Lackmusmilch	+ / 1	+ / 1	+ / 7	+ / 1	+ / 1
Wachstum bei 45°C	-	-	-	-	-
2% NaCl	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
4% NaCl	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1	+ / 1
6% NaCl	-	-	-	+ / 3	+ / 1
Ausfällung mit 3-fachem Volumen 96% Äthanol	+	+	+	+	+
pH-Endwert nach 2 Tagen bei 40 % Saccharose im Nährsubstrat	3,5	3,6	4,6	3,9	3,4
Kolonienform auf Saccharose- nährboden wie bei St/227	+	+	+	+	+
Konsistenz der flüssigen Saccharosekultur: v/b.	b.	b.	b.	b.	b.

+ = Reaktion positiv

- = Reaktion negativ

Zahlen nach dem Querstrich: Tage, nach denen die Reaktion positiv war

b.= belagbildend

v.= viskös

2. Bakterienanzucht

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren obengenannte Streptokokkenstämme, die als StICKKulturen auf festen Nährböden im Kühlschrank aufbewahrt und alle 3 Wochen frisch überimpft wurden. Aus diesen StICKKulturen wurden Streptokokken für die Einzeluntersuchungen mit einer sterilen Platinöse entnommen und in 6 ml flüssiges Vorkulturmedium in verschließbarem Reagenzglas gegeben. Dieses wurde 24 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden etwa 3 ml der Vorkultur mit den darin aufgewachsenen Bakterien in ca. 70 ml flüssiges Hauptkulturmedium, das in verschließbaren Flaschen aufgehoben wurde, steril abgefüllt und erneut bei 37°C bebrütet. Die Inkubationsdauer wurde dabei variiert: jeder Stamm wurde 12, 18 oder 24 Std. lang bebrütet.

3. Herstellung der Nährböden

a) feste Nährböden zur Herstellung der StICKKulturen:

Thioglycolate Broth (Difco)	29,00 g
Agar (Difco)	12,00 g
D(+)-Glucose (Merck, Art.8342)	4,50 g

Diese Substanzen wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und bei 120°C im Autoklaven sterilisiert.

b) flüssige Nährböden zur Herstellung der Vor- und

Hauptkulturmedien:

Tryptose (Difco)	20,00 g
NaCl (Merck, Art. 6404)	2,50 g
Hefeextrakt (Difco)	4,00 g
L-Cystein (Difco)	0,05 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (Merck, Art. 6580)	2,50 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Merck, Art. 6346)	0,60 g

dazu wurde 900 ml Aqua dest. gegeben. Getrennt davon wurde D(+)-Glucose (Merck, Art. 8342) 10,00 g mit 100 ml Aqua dest. aufgeschwemmt. Beide Ansätze wurden bei 120°C im Autoklaven sterilisiert, anschließend gut miteinander vermischt und in sterile Reagenzgläser und 100 ml Flaschen mit Schraubverschluß abgefüllt.

B. Manometrie

1. Prinzip

Mittels der manometrischen Methode von Otto WARBURG können Änderungen von Gasvolumina, die durch Stoffwechselvorgänge bedingt sind, erfaßt werden. Sie wurde von UMBREIT et al (15) ausführlich beschrieben.

2. Ansätze

In die Reaktionsgefäße wurde bei allen Versuchen ein Gesamtvolumen von 2,5 ml pipettiert:

Hauptgefäß:	1,00 ml Bakteriensuspension	(a.)
	1,00 ml Bicarbonatpuffer	(b.)
Seitenarm :	0,25 ml Glukoselösung	(c.)
	0,25 ml Fluoridlösung oder	
	Aqua dest.	(d.)

a) Bakteriensuspension

Die Bakterien einer Hauptkulturflasche wurden 5 min lang bei 3000 - 3500 U/min abzentrifugiert, anschließend 2 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und wiederum zentrifugiert. Die abzentrifugierten Bakterien wurden dann mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und die Dichte nephelometrisch im

Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 575 \text{ nm}$ (s. F.SCHMIDT, 13) gemessen. Es wurde bei der Auswertung meiner Versuche jedoch davon abgesehen die unterschiedlichen Dichtewerte rechnerisch zu korrigieren, da die Fluoridhemmung prozentual angegeben wird.

b) Bicarbonatpuffer

98,9 mg NaHCO_3 wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst

c) Glucoselösung

1,9817 g Glucose (Merck, Art. 8342) wurde in 100 ml Aqua dest. gelöst. Die Glucoselösung hatte eine Konzentration von 1/10 M, wurde jedoch beim Zugeben zum Gesamtansatz um das Zehnfache verdünnt, so daß sich eine Endkonzentration von 1/100 M, bezogen auf den Gesamtansatz, ergab.

d) Fluoridlösungen

1. Natriumfluorid

Es wurden Fluoridlösungen mit einem F-Gehalt von 5000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm und 500 ppm hergestellt, die bei Zugabe zum Gesamtvolumen von 2,5 ml zehnfach verdünnt wurden und so als Konzentration von 500 ppm, 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm und 50 ppm wirksam werden konnten.

2. Amin-Fluoride

Aus den Substanzgemischen 297/335 der GABA AG, Basel, wurden F-Konzentrationen von 10 ppm, 8 ppm, 5 ppm, 3 ppm und 1 ppm hergestellt, die - bezogen auf den Warburg-Ansatz - Konzentrationen von 1 ppm, 0,8 ppm, 0,5 ppm, 0,3 ppm und 0,1 ppm ergaben.

C. Versuchsbeschreibung

Für die Versuche standen 13 Warburg-Gefäße zur Verfügung. Davon diente eines als Thermobarometer, um Luftdruckschwankungen erfassen zu können. Die übrigen Reaktionsgefäße wurden jeweils mit Bakteriensuspension und Pufferlösung, die Seitenarme mit Glucoselösung und Fluoridlösungen bzw. Aqua dest. beschickt. Auf Grund dieser Anordnung konnten ungehemmter und gehemmter Reaktionsverlauf nebeneinander verfolgt werden. Anschließend wurden die Manometer angeschlossen und in ein Wasserbad mit der konstanten Temperatur von 37°C eingehängt. Nun wurde 10 min bei offenem System mit einer Frequenz von 120/min geschüttelt und dadurch ein Temperatúrausgleich in den Warburg-Gefäßen erreicht. Während dieser Zeit durchströmte die Gefäße ein Gasgemisch aus 95 Vol% Stickstoff und 5 Vol% Kohlendioxyd. Danach wurden alle Manometer auf einen Ausgangswert um 150 eingestellt und das System geschlossen. Der Inhalt der Seitenarme wurde jetzt in das Hauptgefäß gegeben und der Versuch unter fortlaufendem Schütteln gestartet. Die einsetzende CO₂-Entwicklung wurde in regelmäßigen Zeitabständen abgelesen und protokolliert. Diese Werte wurden mit dem Wert des Thermobarometers korrigiert und mit der Gefäßkonstanten multipliziert. Die so errechnete Gasmenge wurde in μ l angegeben.

IV. Ergebnisse

=====

Die Ergebnisse wurden in Tabellen festgehalten und für alle Stämme graphisch dargestellt. Was für Bilder sich daraus ergeben, veranschaulichen die in Abb. 1 aufgezeichneten Diagramme. Ich habe als Beispiel den Stamm 275 nach 18 Std Inkubationszeit gewählt und möchte dazu näher erläutern, was aus diesen Darstellungen hervorgeht. Sie zeigen das bei der bakteriellen Säureproduktion entstehende aus dem Bikarbonatpuffer freigesetzte Kohlendioxyd unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Natriumfluorid oder Aminfluorid zu verschiedenen Zeiten. Zur Kontrolle wurde dabei immer der ungehemmte Reaktionsverlauf verfolgt.

Um den Hemmungsgrad der Fluoride auf den Kohlenhydratabbau innerhalb der einzelnen Stämme und zwischen den verschiedenen Streptokokkenstämmen vergleichen zu können, wurden jeweils die Werte nach 45 min Laufzeit aufgezeichnet und prozentual auf die ungehemmte Kohlendioxydproduktion bezogen.

A. Der Einfluß von Natriumfluorid

Zunächst sollen die untersuchten Stämme einzeln betrachtet werden und das Ausmaß der Fluoridhemmung nach 24, 18 und 12 Std Brutdauer verglichen werden. Die Ergebnisse sind aus den Abb. 2a und 2b ersichtlich. Die hier aufgezeichneten Diagramme vermitteln einen Überblick über den prozentualen Glukoseumsatz nach Hinzufügen verschiedener Fluoridkonzentrationen. Die OMZ-Stämme produzierten mit Ausnahme von OMZ 176 nach 24 Std Inkubationszeit jedoch nur so geringe CO₂-Mengen, daß diese Werte nicht in die Diagramme aufgenommen wurden.

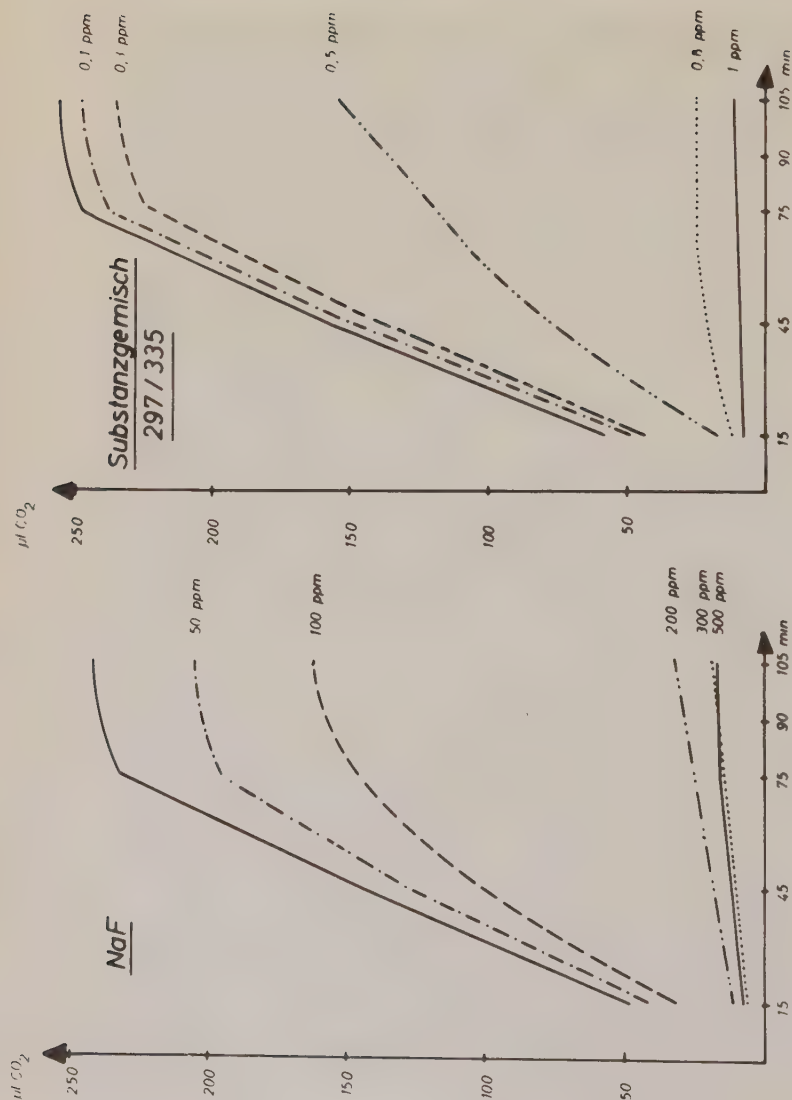


Abb. 1: Gehemmte und ungehemmte CO_2 -Entwicklung nach 18 Std
Inkubation (St. 275)

Den Diagrammen kann man folgendes entnehmen:

1. Die Fluoridionen beeinflussen den bakteriellen Stoffwechsel der meisten untersuchten Bakterienarten nach 24, 18 und 12 Std Brutzeit unterschiedlich. Einige Streptokokkenstämme reagieren jedoch auf bestimmte F-Konzentrationen nach allen drei Anzuchtzeiten ähnlich. Das ist deutlich am Beispiel von Stamm 290 oder 249 zu sehen.

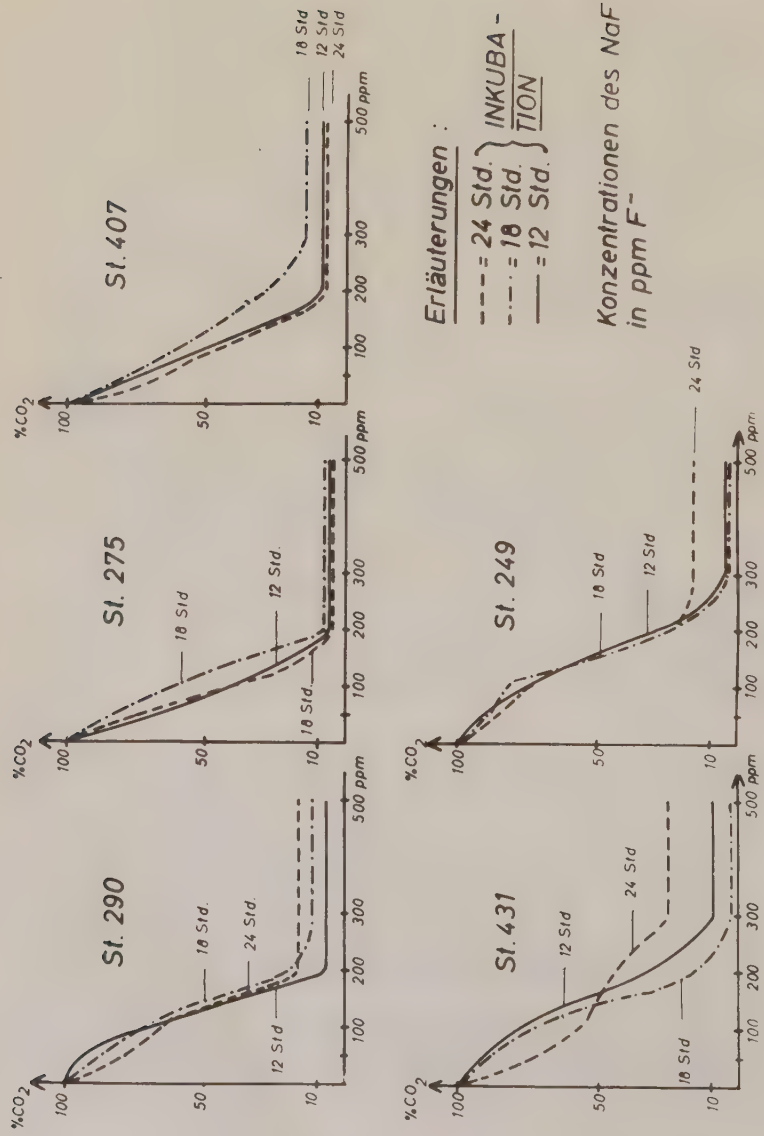
Stamm 290 produzierte nach Zugabe von 100 ppm F:

nach 24 Std Brutdauer	ca. 67 % CO ₂
nach 18 Std Brutdauer	ca. 73 % CO ₂
nach 12 Std Brutdauer	ca. 70 % CO ₂

2. 50 und 100 ppm Fluorid bewirken bei den OMZ-Stämmen nach 18 Std Inkubation eine stärkere Hemmung als nach 24 und 12 Std. Bei den Stämmen 290, 275, 407, 431 und 249 liegen die Werte zwischen denen nach 24 und 12 Std Brutzeit, oder sie sind geringer.
3. 300 ppm F und höhere Konzentrationen unterbinden die Säureproduktion von OMZ 176, St. 431 und 249 vollständig. Die glykolytischen Enzyme der übrigen Stämme werden bereits ab 200 ppm völlig inaktiviert.

Als nächstes interessiert die Frage, ob die untersuchten Streptokokkenarten auf Fluorideinwirkung ähnlich oder unterschiedlich reagieren. Zum Vergleich zwischen den verschiedenen Stämmen dienen Säulendiagramme. Sie geben die Werte nach 12 Std Inkubation wieder, da hier ein Vergleich am aufschlußreichsten erschien. Die Diagramme (Abb. 3) lassen folgende Aussagen zu:

1. Eine Reihe von Bakterienstämmen zeigen nach Einwirkung bestimmter Fluoridkonzentrationen ein vergleich-



Erläuterungen :
 --- = 24 Std. } INKUBA -
 - - - = 18 Std. } TION
 — = 12 Std.
 Konzentrationen des NaF
 in ppm F-

Abb. 2a: Prozentuale Hemmung durch verschiedene NaF-Konzentrationen

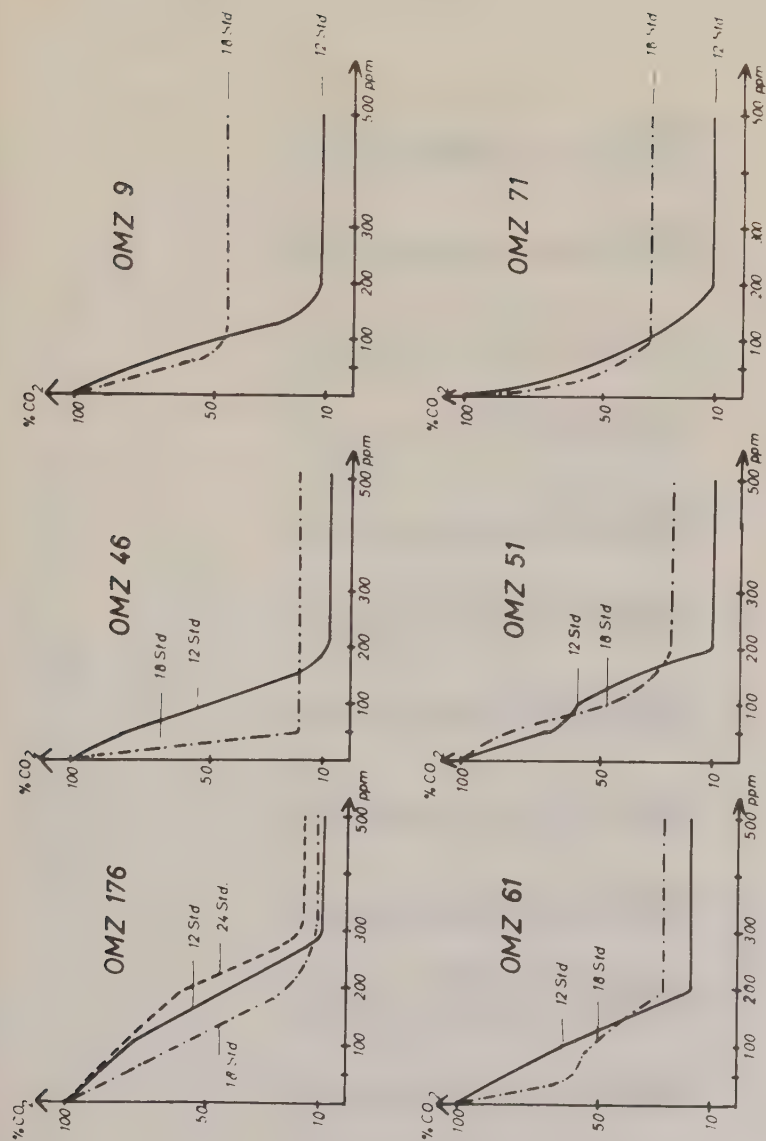


Abb. 2b: Prozentuale Hemmung durch verschiedene NaF-Konzentrationen

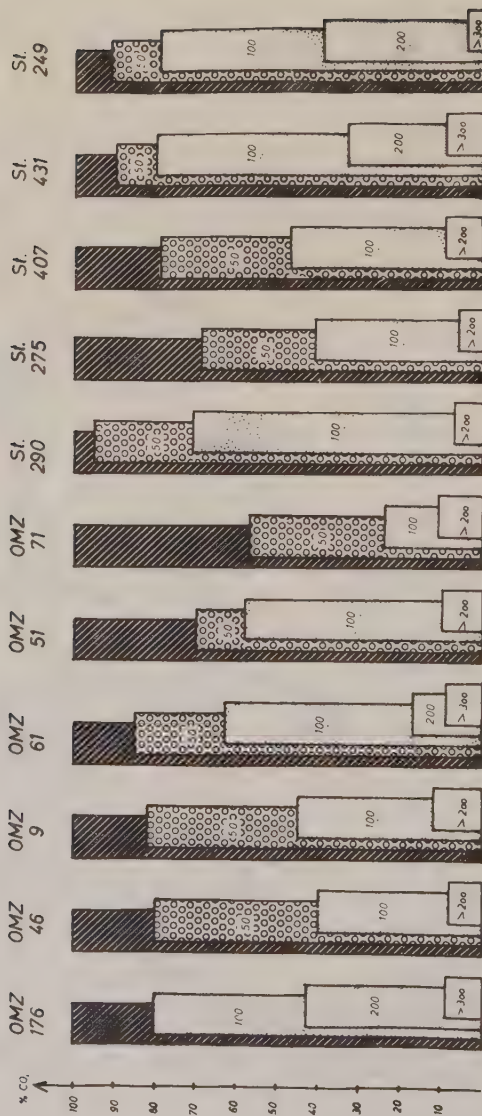


Abb. 3: Prozentuale Hemmung verschiedener NaF-Konzentrationen nach 12 Std Inkubation

bares Verhalten. So lassen sich unter den untersuchten Stämmen zwei Gruppen mit untereinander ähnlichem Verhalten finden:

- a. OMZ 176, Stamm 431 und 249,
- b. OMZ 9 und OMZ 46.

Die übrigen Stämme lassen keine Gesetzmäßigkeiten erkennen.

2. Die unter 1a und b aufgeführten Gruppen mit ähnlicher Reaktion auf Fluorideinwirkung zeigen hinsichtlich ihrer von GUGGENHEIM (8) und GEHRING (7) beschriebenen Stoffwechseleigenschaften nicht dieselben Zuordnungsmöglichkeiten.
3. Einige Stämme vermindern durch Hinzufügung von 100 ppm F^- ihre Gasentwicklung im gleichen Maße:
 - a. OMZ 176, St. 431, 290 und 249 produzieren ca. 80 % CO_2 ,
 - b. OMZ 46, OMZ 9, St. 275 und 407 setzen dagegen nur etwa 45 % Glukose um.
4. Große Unterschiede der Fluoridhemmung fallen bei der Konzentration 100 ppm F^- auf. Das verdeutlicht folgendes Beispiel:
Die unter 3a und b genannten Gruppen entwickeln 80% und 45% CO_2 , OMZ 71 sogar nur 25%.
5. Für OMZ 176, St. 431 und 249 sind zur vollständigen Hemmung des Säurebildungsvermögens 300 ppm F^- und höhere Konzentrationen erforderlich. Bei den meisten Stämmen genügen jedoch bereits Konzentrationen ab 200 ppm F^- .

B. Der Einfluß von Aminfluorid

Wie die Mikroorganismen auf eine organische Fluorverbindung reagieren, soll im folgenden Abschnitt untersucht werden. Dabei möchte ich wie oben zunächst die Stämme einzeln betrachten und ihr Verhalten gegenüber dem organischen Substanzgemisch 297/335 nach 24, 18 und 12 Std Inkubation aufzeigen. OMZ 9 und 71 lieferten nur nach 12 Std Brutdauer brauchbare Werte. Nach den längeren Inkubationszeiten produzierten sie so geringe CO_2 -Mengen, daß diese Ergebnisse nicht ausgewertet wurden. Aus den oben schon genannten Gründen wurden auch die 24-Std-Werte der OMZ-Stämme - ausgenommen von OMZ 176 - nicht in die Diagramme aufgenommen.

Die Kurvenverläufe der einzelnen Darstellungen in den Abb. 4a und 4b sagen folgendes aus:

1. Aminfluorid beeinflusst die Säurebildung nach 24, 18 und 12 Std Inkubationsdauer unterschiedlich. OMZ 61 und St. 431 weisen jedoch einige Gemeinsamkeiten auf: Nach allen 3 Inkubationszeiten sind bei beiden Stämmen annähernd gleiche Kurvenverläufe zu beobachten.
2. Aus den Diagrammen geht hervor, daß die Wirkung von $0,5 \text{ ppm F}^-$ auf das Säurebildungsvermögen der Stämme 290, 275, 407 und 249 bei den 3 Brutzeiten recht unterschiedlich ist. Die Stämme OMZ 46, St. 249 und 407 lassen diese Unterschiede auch bei $0,3 \text{ ppm}$ erkennen.
3. Der Glukoseumsatz aller Bakterien wird von 1 ppm Aminfluorid weitgehend reduziert. Dieses Ergebnis wurde nach 24, 18 und 12 Std Inkubation beobachtet und gilt bei den meisten Stämmen auch für $0,8 \text{ ppm}$.

Eine vergleichende Betrachtung des Hemmungseffektes von Aminfluorid auf die untersuchten Streptokokkenarten erlauben die Säulendiagramme der Abb. 5. Sie führen zu nachfolgenden Aussagen:

1. Die einzelnen Stämme sprechen auf die verschiedenen Fluoridkonzentrationen unterschiedlich an. Sie lassen sich nicht in dieselben Gruppen einordnen wie die von Natriumfluorid beeinflussten Stämme.

2. Trotz dieser Feststellung möchte ich mit folgenden Beispielen darauf hinweisen, daß manche Stämme auf die eine oder andere Fluoridkonzentration ähnlich reagieren:

a. 0,1 ppm Aminfluorid übt auf die CO_2 -Entwicklung aller untersuchten Bakterien etwa die gleiche geringe Hemmwirkung aus.

b. OMZ 9, OMZ 71 und St. 275 entwickeln bei Zugabe von 0,5 ppm Aminfluorid aus dem Glukoseabbau nur noch 60 % der normalerweise produzierten Säuren.

3. Große Unterschiede hinsichtlich ihrer Reaktion auf organisches Fluorid zeigen die Streptokokken bei 0,5 ppm F^- besonders deutlich:

OMZ 46, St. 431 entwickeln	ca. 8-10 % CO_2
OMZ 176, OMZ 61, St. 407 und 249	ca. 20 % CO_2
OMZ 9, OMZ 71 und St. 275	ca. 60 % CO_2
OMZ 51 und St. 290	ca. 75 % CO_2

4. 0,5 ppm F^- hemmt das Säurebildungsvermögen von OMZ 46 und St. 431 bereits vollständig. Die Gasentwicklung der übrigen Mikroorganismen wird von 0,8 ppm F^- und höheren Konzentrationen völlig unterbunden.

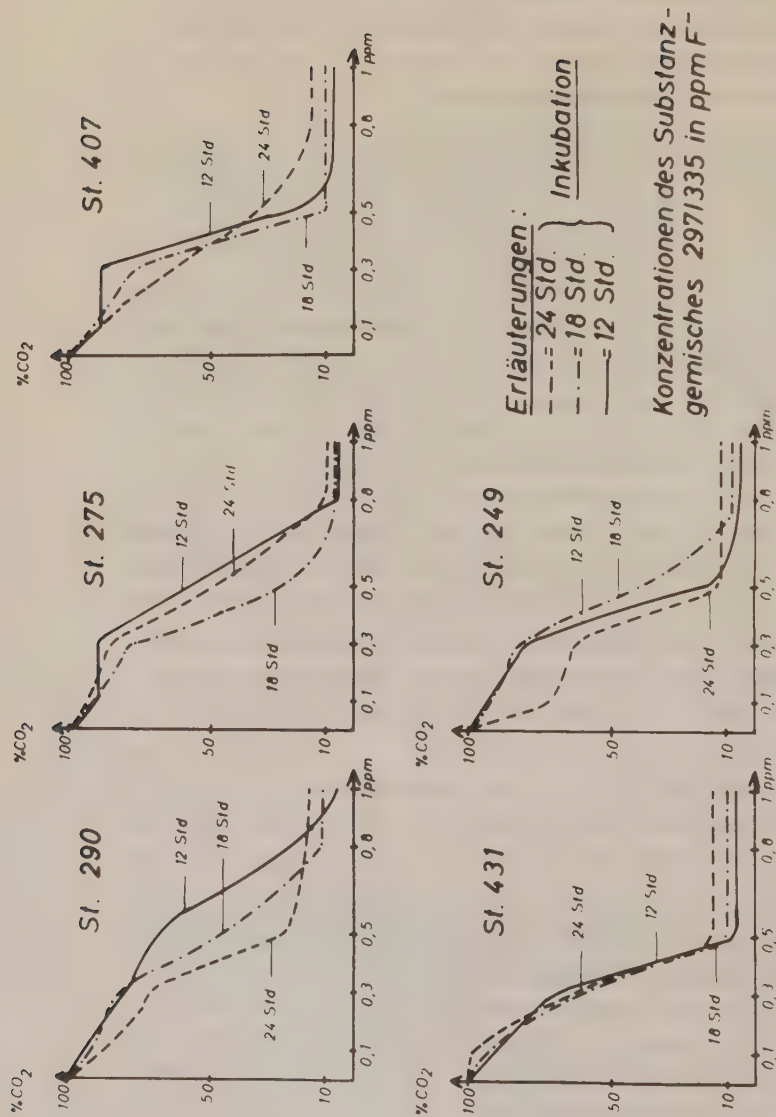


Abb. 4a: Prozentuale Hemmung durch verschiedene Konzentrationen des Substanzgemisches 297/335

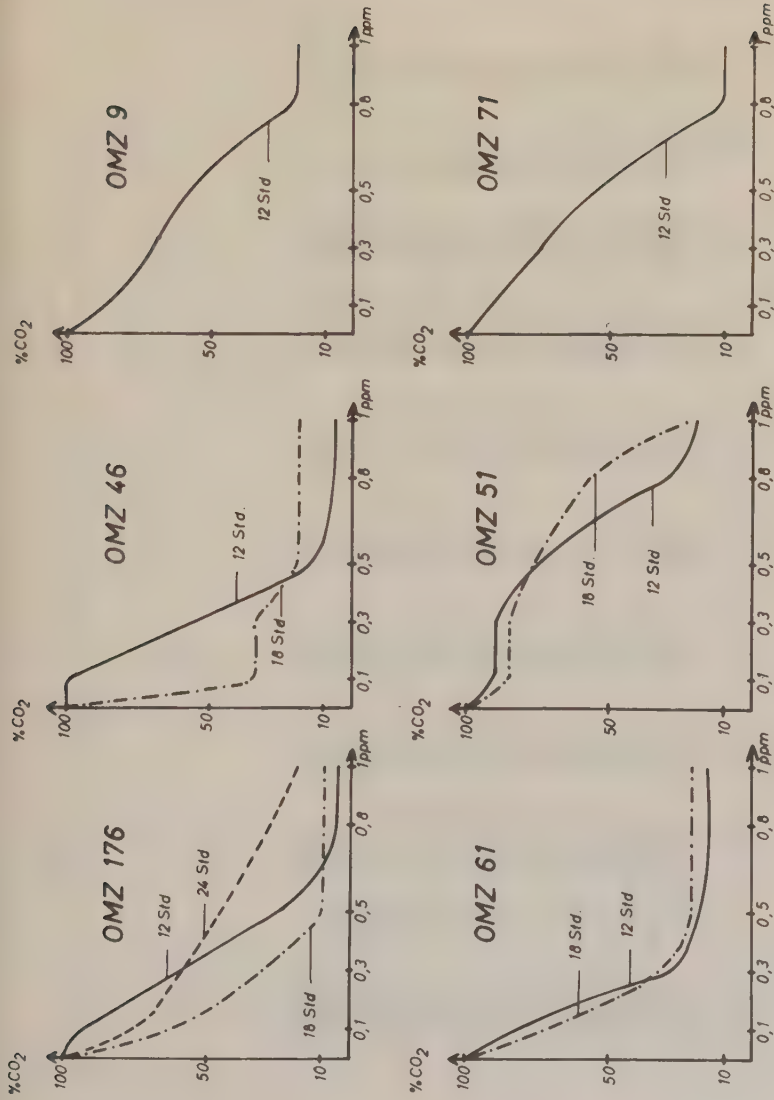


Abb. 4b: Prozentuale Hemmung durch verschiedene Konzentrationen des Substanzgemisches 297/335

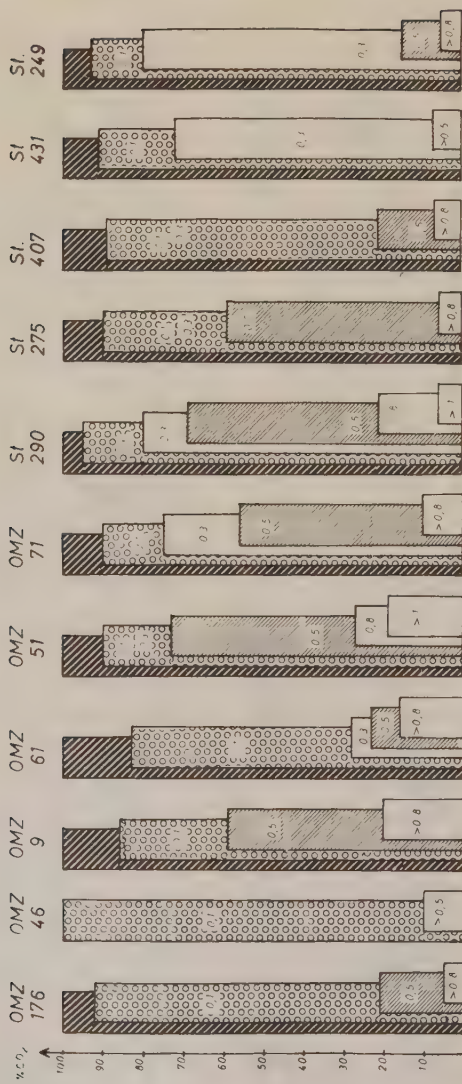


Abb. 5: Prozentuale Hemmung durch verschiedene Konzentrationen des substanzgemisches 297/335 nach 12 Std Inkubation

C. Vergleich des Hemmeffektes von Natriumfluorid und Aminfluorid

Die in den Abbildungen dargestellten und unter A. und B. beschriebenen Ergebnisse weisen deutlich auf 2 entscheidende Unterschiede in der Wirkungsweise von Natrium- und Aminfluorid hin:

1. Aufgrund ihres ähnlichen Verhaltens gegenüber Natriumfluorid erlauben die Stämme OMZ 176, St. 431 und 249 sowie die Stämme OMZ 9 und OMZ 46 die Einordnung in je eine Gruppe. Unter Einwirkung von Aminfluorid hingegen zeigen weder diese noch andere Stämme Gesetzmäßigkeiten, die eine auch nur ähnliche Zuordnung in Gruppen ermöglichen würde.
2. Aminfluorid erweist sich in seiner Hemmwirkung um ein Vielfaches wirksamer als Natriumfluorid: es benötigt wesentlich niedrigere Konzentrationen, um denselben Hemmeffekt zu erzielen. Ein gutes Beispiel dafür bietet St. 290 nach 12 Std Inkubation:
500 ppm NaF hemmt die bakterielle Säureproduktion vollständig: nach 45 min Versuchsdauer wurde eine CO_2 -Entwicklung von 13 μl gegenüber 230 μl im ungehemmten Zustand errechnet.
1 ppm Aminfluorid hemmt ebenfalls vollständig: nach 45 min wurden dieselben Werte wie oben errechnet.

Die hemmende Wirkung der Aminfluoride auf die glykolytischen Enzyme der untersuchten Bakterien ist damit etwa 500 mal größer als die des Natriumfluorids.

V. Diskussion

=====

Die Versuchsergebnisse zeigen deutlich die unterschiedliche Beeinflußbarkeit des Säurebildungsvermögens kariogener Plaquestreptokokken durch anorganische und organische Fluoridverbindungen. Obwohl teilweise ein gruppenähnliches Verhalten einiger Stämme unter dem Einfluß gegenüber Natriumfluorid zu beobachten ist, lassen sich die meisten Bakterienstämme nicht in klar trennbare Gruppen einordnen. Deshalb darf die Wirkung des Fluorids auf den Kohlenhydratabbau von Plaquestreptokokken nicht verallgemeinert werden. Vielmehr konnte hier nachgewiesen werden, daß sich die einzelnen Streptokokkenarten nicht nur durch unterschiedliche Stoffwechselleistungen auszeichnen, sondern auch sehr unterschiedlich auf Fluorid reagieren.

Bei dem Vergleich des Einflusses von anorganischem und organischem Fluorid auf die Bakterien fiel einerseits das unterschiedliche Verhalten der Stämme unter NaF und Aminfluorid auf. Im Gegensatz steht dazu andererseits die bemerkenswerte Wirksamkeit außerordentlich niedriger Konzentrationen von Aminfluorid.

Letzteres unterstützt die von BRAMSTEDT und BANDILLA (2) beschriebenen Ergebnisse, obwohl diese Autoren mit anderen Streptokokkenstämmen und einem anderen organischen Substanzgemisch arbeiten.

Dies alles spricht dafür, daß nicht nur das Fluoridion allein eine Verminderung der bakteriellen Säureproduktion bewirkt, sondern daß auch die Art der Fluorverbindung das Ausmaß der Hemmung beeinflusst. Wie schon BRAMSTEDT und BANDILLA (2) in der Diskussion ihrer Ergebnisse darlegten, handelt es sich bei der organischen Fluorverbindung um eine stark oberflächenaktive

Substanz, die mit den Proteinen der Bakterienzellwand eine Verbindung einzugehen vermag. Auf diese Weise können größere Fluoridmengen in die Zellen eingeschleust werden und dort im Sinne einer Hemmung aktiv werden. Eine andere Erklärung wäre darin denkbar, daß der Zellstoffwechsel durch die Besetzung der Zelloberfläche mit Aminen behindert wird. Vom praktischen Standpunkt aus betrachtet kann durch Verabreichung von Aminfluoriden eine wirksame Kariesprophylaxe betrieben werden, weil - wie diese Untersuchungen zeigen - schon relativ niedrige Konzentrationen den bakteriellen Kohlenhydratabbau beträchtlich beeinflussen und so den Säureangriff auf die Apatitkristalle vermindern.

Die Bakterienbeläge weisen Fluoridkonzentrationen von 30 - 50 ppm auf (KÖNIG, 10). Sie können durch exogene Fluoridzufuhr kurzzeitig auch auf höhere Werte ansteigen, was u.a. auch aus Untersuchungen von LOESCHE, MURRAY und MELLBERG (11) hervorgeht. Die hier vorgelegten Versuchsergebnisse lassen deutlich erkennen, daß bereits Konzentrationen von 50 und 100 ppm F^- eine Verlangsamung des Glukoseumsatzes bewirken, die bei den einzelnen Stämmen allerdings verschieden stark ist. Die Fluoridkonzentrationen reichen also aus, das Säurebildungsvermögen der für die Kariesgenese wichtigen Bakterien zu reduzieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen eindeutig für die Beeinflußbarkeit des Energiestoffwechsels einiger kariogener Plaquestreptokokken in vitro. Auch LOESCHE, MURRAY und MELLBERG (11) wiesen in ihren Versuchen mit 14 - 16jährigen Schuljungen die antibakterielle Wirksamkeit des Fluoridions für *S. mutans* nach: nach 6-tägiger Anwendung einer sauren Phosphat-Fluorver-

bindung nahm die Bakterienzahl von *S. mutans* deutlich ab. Dies kann als Folge einer Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels durch Fluorid gedeutet werden. Für *S. sanguis* konnten die Autoren (11) allerdings keine gleichartige Verminderung der Bakterienzahl feststellen. Dies unterstreicht letztlich nur unsere Beobachtungen über die großen Unterschiede zwischen den hier untersuchten Streptokokkenstämmen.

Die vorliegende Arbeit leistet damit einen Beitrag zur Erforschung der Eigenschaften kariogener Plaque-Streptokokken. Sie gibt Auskunft über deren Verhalten gegenüber Fluoriden und begründet die Möglichkeit kariesprophylaktischer Maßnahmen durch Hemmung der bakteriellen Säureproduktion.

VI. Zusammenfassung =====

Mit Hilfe der Warburg-Methode wird der Einfluß von NaF und Aminfluorid in je 5 verschiedenen Konzentrationen auf das Säurebildungsvermögen von 11 isolierten Streptokokkenstämmen untersucht.

I. Die Untersuchungen mit Natriumfluorid erlauben folgende Aussagen:

1. Der Kohlenhydratabbau der untersuchten Plaquebakterien wird durch NaF unterschiedlich beeinflusst, einige Stämme zeigen jedoch gruppenähnliches Verhalten.

2. Im Experiment treten auch durch Veränderung der Zeit für die Anzucht der Streptokokken Unterschiede auf.
3. Stämme mit ähnlicher Reaktion auf NaF zeigen beim Vergleich ihrer Stoffwechseleigenschaften nicht dieselben Zuordnungsmöglichkeiten.
4. Bei der relativ hohen Konzentration von 100 ppm F^- wurde die Säureproduktion zwischen 25 und 80 % gehemmt.
5. 300 ppm F^- und höhere Konzentrationen hemmen die CO_2 -Entwicklung nach allen 3 Inkubationszeiten vollständig.

II. Der Einfluß des Aminfluorids läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Schon außerordentlich geringe Konzentrationen üben auf die Säurebildung einen hohen Hemmeffekt aus. Er entspricht im Vergleich zu NaF etwa dem 500-fachen.
2. Die Plaquebakterien reagieren auf Aminfluorid anders als auf NaF, was auf eine spezifische Wirkung der Amine zurückgeführt wird.
3. Aufgrund der unterschiedlichen Hemmungswirkung des Aminfluorids auf den Bakterienstoffwechsel lassen die einzelnen Stämme keine Zuordnungsmöglichkeiten in Gruppen erkennen.
4. Die Bakterien verhalten sich unter Einwirkung von 0,5 ppm Aminfluorid ähnlich unterschiedlich wie bei 100 ppm NaF.
5. 0,8 ppm Aminfluorid und höhere Konzentrationen bewirken eine vollständige Hemmung des Kohlenhydratabbaus der untersuchten Streptokokkenstämme.

SCHRIFTTUM

=====

1. BRAMSTEDT, F.: Der Wirkungsmechanismus der Fluoride als karieshemmende Substanzen
Dtsch.zahnärztl.Z. 23, 111 (1968)
2. BRAMSTEDT, F. und BANDILLA, J.: Über den Einfluß organischer Fluorverbindungen auf Säurebildung und Polysaccharidsynthese von Plaquestreptokokken
Dtsch.zahnärztl.Z. 21, 1390 (1966)
3. BRAMSTEDT, F. und TRAUTNER, K.: Zuckeraustauschstoffe und Biochemie der Zahnplaque
Dtsch.zahnärztl.Z. 26, 1135 (1971)
4. CAPOZZI, L., BRUNETTI, P., NEGRI, P.L. and MIGLIORINI, E.: Enzymatic Mechanism of Action of Some Fluorine Compounds.
Caries Res. 1, 69 (1967)
5. CIMASONI, G.: Fluoride and Enzymes. In: Vischer, T.L. (Hrsg.): Fluoride in medicine. Huber, Bern 1970, S. 14
6. CIMASONI, G.: The Inhibition of Enolase by Fluoride in vitro
Caries Res. 6, 93 (1972)
7. GEHRING, F.: Extrazelluläre Polysaccharide bildende Streptokokken aus Zahnplaques und ihre Beziehung zur Zahnkaries
Habil., Schr. Würzburg
Carl Hanser Verlag, München 1972
8. GUGGENHEIM, B.: Streptococci of Dental Plaques
Caries Res. 2, 147 (1968)
9. JENKINS, G.N.: Mechanism of action of fluoride in reducing dental caries. In: Vischer, T.L. (Hrsg.): Fluoride in medicine. Huber Bern 1970, S. 88
10. KÖNIG, K.G.: Karies und Kariesprophylaxe
Wilhelm Goldmann, München 1971
11. LOESCHE, W.J., MURRAY, R.J. and MELLBERG, J.R.: The Effect of Topical Acidulated Fluoride on Percentage of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis in Interproximal Plaque Samples.
Caries Res. 7, 283 (1973)

12. RANKE,B. und RANKE,E.: Untersuchungen zur Kario-
genität extrazelluläre Polysaccharide bildender
Streptokokken aus menschlicher Zahnplaque
Dtsch.zahnärztl.Z. 26, 29 (1971)
13. SCHMIDT,F.: Med.Diss., Erlangen-Nürnberg 1974,
in Vorbereitung
14. SCHWARZ,W.: Zum Kohlenhydratmetabolismus kariogener
Streptokokken
Chem. Diplomarbeit Erlangen 1973
15. UMBREIT,W.W.: BURRIS,R.H. und STAUFFER,J.F.:
Manometric technique, 4th ed.-Burgess Publishing
Company, Minneapolis (1964)

Meinem Vater, Herrn Prof. Kröncke, danke ich
an dieser Stelle für die Überlassung des Themas
und für die Anleitung bei der Durchführung meiner
Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 11. Februar 1950 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Dr. Adolf Kröncke und seiner Ehefrau Dr. Sunnhild Kröncke, geborene Gassmann, in Hamburg geboren.

Ostern 1957 wurde ich in Hamburg-Hausbruch eingeschult. 1959 verzogen wir nach Tübingen, wo ich 1961 in das Wildermuth-Gymnasium aufgenommen wurde. Im Frühjahr 1965 siedelten wir nach Erlangen über. Hier besuchte ich das Christian-Ernst-Gymnasium ("Musisches Gymnasium") und legte im Sommer 1969 mit Erfolg die Reifeprüfung ab.

Im WS 1969/70 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Universität Erlangen-Nürnberg und bestand nach dem WS 1971/72 die zahnärztliche Vorprüfung. Nach dem Sommer-Semester 1974 lege ich das zahnärztliche Staatsexamen ab.

